

PENCIRIAN PENCILAN BAKTERIA ANAEROB SELULOLITIK DAN
LIGNINOLITIK DALAM BIODEGRADASI SISA BATANG PISANG

NURUL FATEHAH BINTI ABDUL GHAFAR

Tesis yang dikemukakan untuk memenuhi syarat memperoleh ijazah Sarjana Sains
Bioteknologi

Fakulti Sains Industri dan Teknologi
UNIVERSITI MALAYSIA PAHANG

APRIL 2012

ABSTRAK

Biojisim tumbuhan merupakan sumber biojisim lignoselulosik utama yang kaya dengan komponen-komponen organik dan merupakan sumber yang boleh diperbaharui yang meliputi sebahagian besar sisa perbandaran dan pertanian di seluruh negara di seluruh dunia. Bagi mengatasi masalah pencemaran alam sekitar akibat pengumpulan sisa-sisa berlignoselulosik ini, sisa-sisa pertanian boleh dijadikan sumber biojisim untuk menjana sumber tenaga alternatif seperti biometana (biogas) menerusi proses pencernaan anaerobik. Sisa lignoselulosik terdiri daripada tiga komponen utama iaitu lignin, selulosa, dan hemiselulosa. Lignin merupakan polimer aromatik yang disintesis daripada pelopor fenilpropanoid dan sangat rintang kepada penguraian mikrob disebabkan oleh strukturnya yang kompleks. Justeru, bagi meningkatkan penghasilan biogas, penyingkiran lignin perlu dilakukan supaya tindakan berenzimatik ke atas selulosa oleh mikrob dapat berlaku secara efisien. Tujuan kajian ini dijalankan adalah untuk memencil, menyaring, mengenalpasti, dan mencirikan pencilan bakteria anaerobik daripada tanah yang telah disesuaikan (acclimatized) dengan sisa batang pisang yang berpotensi sebagai pengurai lignin dan selulosa sisa ini. Lima pencilan bakteria selulolitik (CB) berpotensi telah dipilih setelah disaring melalui kaedah asai piring karboksimetilselulosa (CMC) berdasarkan saiz diameter zon lisis dan dilabel sebagai CB 10, CB 19, CB 120, CB 65, dan CB 67. Saringan ke atas bakteria ligninolitik (LB) berdasarkan pertumbuhan yang efisien pada medium lignin-Kraf telah dijalankan dan lima pencilan yang berpotensi telah dipilih serta dinamakan sebagai LB 2, LB 8Y, LB 9, LB 8, dan LB 35. Kesemua pencilan bakteria mesofilik ini merupakan bakteria Gram positif walaupun menunjukkan ciri 'Gram variability', mempunyai spora, dan berbentuk rod kecuali pencilan CB 19 yang berbentuk kokus dan tidak mengandungi spora. Hasil penjujukan gen 16S rRNA menunjukkan kesemua pencilan terdiri daripada empat genus bakteria yang berbeza iaitu *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Paenibacillus*, dan *Bacillus*. Hasil penyahligninan anaerobik yang telah dijalankan ke atas sisa batang pisang menunjukkan pencilan bakteria LB 2 (*Clostridium beijerinckii* JCM 8026) dan LB 8Y (klon bakteria kompos PS3079 yang tidak dikulturkan) berupaya menghuraikan lignin sisa secara bukan memilih apabila berjaya menyingkirkan lignin sebanyak 14.44% dan 12.05% dan menghuraikan selulosa sebanyak 20.60% dan 32.79%. Pencilan bakteria CB 19 (*Staphylococcus* sp. DG9) dan CB 10 (*C. beijerinckii* NCIMB 8052) didapati tidak mampu memangkin tindak balas hidrolisis selulosa pada sisa yang belum dinyahlignin. Hasil pencernaan sintrofik ke atas sisa oleh ko-kultur CB 19 dan LB 8Y pula menunjukkan data yang tidak konklusif apabila penguraian selulosa berlaku walaupun tiada sebarang penyahligninan berlaku ke atas sisa oleh gabungan bakteria tersebut. Secara kesimpulannya, kajian ini menunjukkan hanya pencilan LB 2 dan LB 8Y berjaya menunjukkan prestasi menyahlignin dan menghuraikan selulosa kepada gula daripada sisa batang pisang.

KANDUNGAN

	Halaman
PENGAKUAN PENYELIA	iv
PENGAKUAN PELAJAR	v
PENGHARGAAN	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
KANDUNGAN	x
SENARAI JADUAL	xviii
SENARAI RAJAH	xx
SENARAI SINGKATAN	xxii

BAB 1 PENGENALAN

1.1	Pendahuluan	1
1.2	Pernyataan Masalah	1
1.2.1	Sisa Pertanian	1
1.2.2	Krisis Bekalan Tenaga Dunia	2
1.2.3	Rawatan Biologi ke atas Struktur Lignin	3
1.2.4	Sisa Batang Pisang	4
1.3	Rasional Kajian	4
1.3.1	Kepentingan Menyaring Dan Mengenalpasti Mikroorganisma Dalam Pra-Rawatan Biologi Untuk Pencernaan Anaerobik	4
1.4	Skop Kajian	5
1.5	Objektif Kajian	6

BAB 2 ULASAN KEPUSTAKAN

2.1	Biojisim Lignoselulosik	7
2.2	Komponen Lignoselulosa	8
2.2.1	Selulosa	9

2.2.1.1	Biodegradasi Selulosa oleh Mikroorganisma Selulolitik	10
(i)	<i>Selulase</i>	11
(ii)	<i>Selulosom</i>	14
2.2.2	Lignin	17
2.2.2.1	Ciri Struktur Molekul Lignin	18
2.2.2.2	Faktor Kerintangan Lignin	18
2.2.2.3	Biodegradasi Lignin oleh Mikroorganisma Ligninolitik	19
(i)	<i>Kulat Pengurai Lignin</i>	19
(a)	<i>Enzim Pengurai Lignin Kulat</i>	21
(ii)	<i>Bakteria Pengurai Lignin</i>	21
(a)	<i>Mekanisme Degradasi Bakteria Ligninolitik</i>	22
2.3	Proses Pencernaan Anaerobik	22
2.3.1	Tahap Metabolisma dan Proses Mikrobiologi dalam Pencernaan Anaerobik	24
2.3.1.1	Hidrolisis dan Asidogenesis	24
2.3.1.2	Asetogenesis	25
2.3.1.3	Metanogenesis	26
2.4	Skop Pemencilan dan Penyaringan Bakteria Ligninolitik dan selulolitik	27
2.4.1	Pemilihan Sumber Biojisim dan Inokulum	27
2.4.2	Kaedah Pemencilan dan Penyaringan Bakteria Pilihan	29
2.4.2.1	Bakteria Ligninolitik	29
2.4.2.2	Bakteria Selulolitik	30
2.5	Skop Pencirian dan Pengenalpastian Bakteria	31
2.6	Analisis Teknikal dalam Kajian Biodegradasi Sisa Lignoselulosa	32
2.6.1	Analisis Lignin	32
2.6.2	Analisis Selulosa	33

BAB 3 METODOLOGI KAJIAN

3.1	Pendahuluan	34
3.2	Pemencilan Bakteria Anaerobik Selulolitik (CB) dan Ligninolitik (LB)	34

3.2.1	Bahan	34
3.2.1.1	Bahan Kimia dan Medium	34
3.2.2	Kaedah	35
3.2.2.1	Persampelan dan Penyesuaian (Acclimatization) Kultur Campuran Tanah Bersama Sisa Batang Pisang	35
3.2.2.2	Penyediaan Agar, Kaldu, dan Larutan	35
3.2.2.3	Pemencilan Bakteria Dari Kultur Campuran	35
	(i) <i>Pemencilan Bakteria Selulolitik</i>	36
	(ii) <i>Pemencilan Bakteria Penghurai Lignin</i>	36
3.3	Penyaringan Pencilan Bakteria CB dan LB	37
3.3.1	Bahan	37
3.3.1.1	Bahan Kimia Dan Medium	37
3.3.2	Kaedah	37
3.3.2.1	Penyaringan Bakteria Selulolitik (Kasana <i>et al.</i> , 2008)	37
3.3.2.2	Penyaringan Bakteria Penghurai Lignin (Morii <i>et al.</i> , 1995)	38
	(i) <i>Teknik Analitikal</i>	38
	(a) <i>Penentuan Pertumbuhan Sel</i>	38
	(b) <i>Pengukuran Keamatan Warna Supernatan Kultur</i>	38
3.4	Pencirian dan Pengenalpastian Pencilan CB dan LB	39
3.4.1	Bahan	39
3.4.1.1	Bahan Kimia dan Medium	39
3.4.1.2	Penanda DNA	39
3.4.1.3	Komponen-komponen Lain Serta Kit	39
3.4.2	Kaedah	40
3.4.2.1	Pemerhatian Morfologi Bakteria	40
	(i) <i>Pewarnaan Gram</i>	40
	(ii) <i>Pewarnaan Endospora</i>	41
3.4.2.2	Penjukkan Gen 16S rRNA	41
	(i) <i>Pengekstrakan Genom Bakteria</i>	41
	(ii) <i>Amplifikasi Jujukan Gen 16S rRNA</i>	42
	(iii) <i>Penulenan dan Penjukkan Produk PCR</i>	43

3.5	Kajian Prestasi Bakteria Pilihan	43
3.5.1	Bahan	43
3.5.1.1	Bahan Mentah	43
3.5.1.2	Bahan Kimia	43
3.5.2	Kaedah	44
3.5.2.1	Kajian Prestasi Bakteria Penyahlignin Pilihan	44
	(i) <i>Penyediaan Medium</i>	44
	(ii) <i>Pencernaan Anaerobik Lignin Sisa Batang Pisang</i>	44
3.5.2.2	Kajian Prestasi Hidrolisis Oleh Bakteria Pilihan Bagi Penghasilan Gula	44
	(i) <i>Penyediaan Medium</i>	44
	(ii) <i>Hidrolisis Selulosa Sisa Batang Pisang</i>	45
3.5.2.3	Kajian Prestasi Gabungan Bakteria Penyahlignin dan Selulolitik Pilihan	45
	(i) <i>Penyediaan Medium</i>	45
	(ii) <i>Pencernaan Anaerobik Ko-kultur ke atas Selulosa Sisa Batang Pisang</i>	45
3.5.3	Teknik Analitikal	46
3.5.3.1	Penentuan Pertumbuhan Sel	46
3.5.3.2	Penentuan Kandungan α -selulosa Sisa Batang Pisang	46
3.5.3.3	Analisis Klason-lignin, KL (NREL, 1995)	47
3.5.3.4	Penentuan Jumlah Glukosa	48

BAB 4 KAJIAN PEMENCILAN, PENYARINGAN, PENCIRIAN, DAN PENGENALPASTIAN BAKTERIA

4.1	Pendahuluan	49
4.2	Pemencilan Bakteria Anaerobik Selulolitik (CB) dan Ligninolitik (LB)	49
4.2.1	Hasil	50
4.2.1.1	Pemencilan Bakteria Selulolitik (CB)	50
4.2.1.2	Pemencilan Bakteria Ligninolitik (LB)	51
4.2.2	Perbincangan	53
4.2.3	Kesimpulan	53

4.3	Penyaringan Pencilan Bakteria CB Dan LB	54
4.3.1	Hasil dan Perbincangan	54
4.3.1.1	Piring Asai Kehadiran Selulase	54
4.3.1.2	Bakteria Penyahlginin	57
4.3.2	Kesimpulan	59
4.4	Pencirian dan Pengenalpastian Pencilan CB dan LB	59
4.4.1	Hasil dan Perbincangan	60
4.4.1.1	Pengenalpastian Bakteria	60
	(i) <i>Pemerhatian Morfologi Kultur Pencilan CB</i>	60
	(ii) <i>Pemerhatian Morfologi Kultur Pencilan LB</i>	62
4.4.1.2	Penjujukan gen 16S rRNA	65
	(i) <i>Pengekstrakan DNA genom pencilan bakteria CB dan LB</i>	65
	(ii) <i>Amplifikasi Gen 16S rRNA</i>	69
	(iii) <i>Penjujukan dan Pencirian ke atas Jujukan Gen 16S rRNA</i>	72
4.4.2	Kesimpulan	76

BAB 5 KAJIAN PRESTASI BAKTERIA PILIHAN

5.1	Pendahuluan	77
5.2	Prestasi Bakteria Penyahlginin Pilihan	77
5.2.1	Hasil Dan Perbincangan	77
5.2.1.1	Penyahlgininan Sisa Batang Pisang oleh Pencilan LB 8Y dan LB 2	77
5.2.1.2	Kandungan Lignin, Selulosa, dan Glukosa	78
5.2.2	Kesimpulan	82
5.3	Prestasi Hidrolisis oleh Bakteria Pilihan bagi Penghasilan Gula	82
5.3.1	Hasil dan Perbincangan	82
5.3.1.1	Kandungan Selulosa dan Glukosa	82
5.3.2	Kesimpulan	87

5.4	Prestasi Gabungan Bakteria Penyah lignin dan Selulolitik Pilihan	88
5.4.1	Hasil Dan Perbincangan	89
5.4.1.1	Kandungan Selulosa, Lignin dan Glukosa	89
5.4.2	Kesimpulan	91

BAB 6 KESIMPULAN DAN CADANGAN KAJIAN LANJUTAN

6.1	Kesimpulan	92
6.2	Cadangan Kajian Lanjutan	94

RUJUKAN 108

LAMPIRAN

A	Carta alir pelaksanaan kerja	108
B	Penyediaan reagen dan medium	109
C	Jujukan pencetus-pencetus yang digunakan dalam amplifikasi jujukan gen 16S rRNA	111
	Komponen yang terlibat dalam tindak balas PCR	111
	Langkah-langkah dan keadaan suhu kitaran dalam PCR	112
	Larian elektroforesis gel agarosa 1%	112
	Manual kit 'G-Spin Genomic DNA Extraction' (Intron, Korea)	113
	Manual kit 'Megaquick Spin PCR & Agarose Gel DNA Extraction' (Intron, Korea)	114
D	Analisis BLAST (blastn) ke atas hasil jujukan gen 16S rRNA pencilan bakteria anaerobik CB 10 (1422bp)	115
	Analisis BLAST (blastn) ke atas hasil jujukan gen 16S rRNA pencilan bakteria anaerobik CB 120 (1432bp)	116
	Analisis BLAST (blastn) ke atas hasil jujukan gen 16S rRNA pencilan bakteria anaerobik CB 19 (1461bp)	117

	Analisis BLAST (blastn) ke atas hasil jujukan gen 16S rRNA pencilan bakteria anaerobik CB 65 (1442bp)	118
	Analisis BLAST (blastn) ke atas hasil jujukan gen 16S rRNA pencilan bakteria anaerobik CB 67 (1475bp)	119
	Analisis BLAST (blastn) ke atas hasil jujukan gen 16S rRNA pencilan bakteria anaerobik LB 2 (1417 bp)	120
	Analisis BLAST (blastn) ke atas hasil jujukan gen 16S rRNA pencilan bakteria anaerobik LB 35 (1480 bp)	121
	Analisis BLAST (blastn) ke atas hasil jujukan gen 16S rRNA pencilan bakteria anaerobik LB 8 (1417 bp)	122
	Analisis BLAST (blastn) ke atas hasil jujukan gen 16S rRNA pencilan bakteria anaerobik LB 8Y (1416 bp)	123
	Analisis BLAST (blastn) ke atas hasil jujukan gen 16S rRNA pencilan bakteria anaerobik LB 9 (1452 bp)	124
E	Rujukan morfologi koloni bakteria	125
	Morfologi kultur 18 pencilan bakteria LB pada piring agar lignin (1g/L) dan NA	126
	Morfologi kultur 25 pencilan bakteria CB pada piring agar NA-CMC (1%)	127
	Jujukan gen 16s rRNA daripada jujukan lengkap gen <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052 (CP000721.1) bersaiz 1505bp	129
F	Graf lengkuk piawai bagi glukosa yang diukur menggunakan kaedah HPLC	130
	Nilai area puncak bagi setiap kepekatan glukosa piawai	130
G	Kandungan berat mutlak lignin selepas tindak balas pencernaan ke atas sisa batang pisang oleh pencilan tunggal LB 8Y	131
	Kandungan berat mutlak selulosa selepas tindak balas pencernaan ke atas sisa batang pisang oleh pencilan tunggal LB 8Y	132
	Kandungan berat mutlak lignin selepas tindak balas pencernaan ke atas sisa batang pisang oleh pencilan tunggal LB 2	133

	Kandungan berat mutlak selulosa selepas tindak balas pencernaan ke atas sisa batang pisang oleh pencilan tunggal LB 2	134
H	Kandungan berat mutlak selulosa selepas tindak balas pencernaan ke atas sisa batang pisang oleh pencilan tunggal CB 10	135
	Kandungan berat mutlak lignin selepas tindak balas pencernaan ke atas sisa batang pisang oleh pencilan tunggal CB 10	135
	Kandungan berat mutlak selulosa selepas tindak balas pencernaan ke atas sisa batang pisang oleh pencilan tunggal CB 19	136
	Kandungan berat mutlak lignin selepas tindak balas pencernaan ke atas sisa batang pisang oleh pencilan tunggal CB 19	136
I	Kandungan berat mutlak selulosa selepas tindak balas pencernaan ke atas sisa batang pisang oleh ko-kultur CB 19 + LB 8Y	137
	Kandungan berat mutlak lignin selepas tindak balas pencernaan ke atas sisa batang pisang oleh ko-kultur CB 19 + LB 8Y	137
J	Peratus selulosa dan lignin pada 1 g sampel sisa batang pisang asal yang belum dicerna oleh mikrob adalah 16.4% dan 55.15%	138

SENARAI JADUAL

No. Jadual	Tajuk	Halaman
2.1	Komponen utama dari hasil sampingan pertanian berselulosik yang berpotensi untuk kegunaan industri	8
2.2	Peratus (%) komposisi lignoselulosa pada residu dan sisa pertanian	9
2.3	Mikroorganisma penghasil selulosom	15
2.4	Kulat yang telah digunakan dalam kajian biodegradasi lignin dari sumber lignoselulosik	20
3.1	Spesifikasi kaedah HPLC yang digunakan bagi kandungan glukosa dalam setiap sampel hasil pencernaan anaerobik	48
4.1	Senarai 25 pencilan bakteria daripada tanah yang berjaya dipencilkan menggunakan piring agar NA-CMC (1%)	50
4.2	Senarai 18 pencilan bakteria daripada tanah yang berjaya dipencilkan menggunakan piring agar lignin (1 g/L)	52
4.3	Pencilan bakteria yang menghasilkan diameter zon hidrolisis yang besar	55
4.4	Nilai pertumbuhan sel bakteria dan keamatan warna medium lignin setelah diinokulkan dengan pencilan bakteria tulen LB	58
4.5	Ciri-ciri morfologi koloni dan sel pencilan bakteria CB	61
4.6	Ciri-ciri morfologi koloni dan sel pencilan bakteria LB	63
4.7	Kepekatan dan kualiti DNA genom pencilan bakteria LB dan CB melalui bacaan spektrofotometer	66
4.8	Kepekatan dan ketulenan produk PCR pencilan bakteria LB dan CB yang diukur melalui bacaan spektrofotometer	71
4.9	Hasil analisis blastn (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast) ke atas jujukan gen 16S rRNA pencilan bakteria yang telah disintesis	73
5.1	Hasil penyahligninan sisa batang pisang oleh pencilan bakteria ligninolitik LB 8Y dan LB 2	80

5.2	Hasil hidrolisis selulosa sisa batang pisang oleh pencilan bakteri selulolitik CB 19 dan CB 10	83
5.3	Hasil pencernaan sisa batang pisang oleh ko-kultur bakteri LB 8Y dan CB 19	89

SENARAI RAJAH

No. Rajah	Tajuk	Halaman
2.1	Struktur selulosa	10
2.2	Skema tindakan enzim selulolitik dalam hidrolisis selulosa kepada glukosa	13
2.3	Skema model selulosom <i>C. cellulovorans</i>	16
2.4	Tiga alkohol aromatik yang merupakan juzuk utama lignin	17
2.5	Skema tapak jalan metabolik dalam pencernaan anaerobik sisa organik kepada metana dan karbon dioksida	24
4.1	Penghasilan selulase ditunjukkan oleh pembentukan zon hidrolisis pada agar CMC oleh bakteria pencilan	55
4.2	Kaldu medium lignin yang telah diinokulkan dengan pencilan bakteria dan dieram selama 8 minggu	57
4.3	Morfologi kultur pencilan CB pada plat agar NA diperhatikan setelah dieram selama 48 jam secara anaerobik pada suhu 30°C	60
4.4	Cerapan morfologi sel pencilan bakteria CB melalui pewarnaan Gram	61
4.5	Cerapan kehadiran endospora pada sel pencilan bakteria CB melalui pewarnaan endospora	62
4.6	Cerapan pertumbuhan pencilan bakteria LB pada plat agar NA	63
4.7	Cerapan morfologi pencilan bakteria LB melalui pewarnaan Gram	64
4.8	Cerapan kehadiran endospora pada pencilan bakteria LB melalui pewarnaan endospora	64
4.9	Profil larian elektroforesis gel agarosa 1% ke atas DNA genom pencilan bakteria CB	67
4.10	Profil larian elektroforesis gel agarosa 1% ke atas DNA genom pencilan bakteria LB	67

4.11	Profil gabungan tiga set larian elektroforesis gel agarosa 1% terhadap produk amplifikasi PCR menggunakan DNA genom pencilan CB sebagai templat	69
4.12	Profil gabungan dua set larian elektroforesis gel agarosa 1% terhadap produk amplifikasi PCR menggunakan DNA genom pencilan LB sebagai templat	70
4.13	Profil gabungan dua set larian elektroforesis gel agarosa 1% terhadap produk amplifikasi PCR pencilan CB yang telah dituliskan	71
4.14	Profil larian elektroforesis gel agarosa 1% terhadap produk amplifikasi PCR pencilan LB yang telah dituliskan	72
5.1	Kandungan mutlak lignin dan α -selulosa yang diperoleh hasil tindak balas pencernaan (penyahligninan) anaerobik oleh pencilan LB 8Y	79
5.2	Kandungan mutlak lignin dan α -selulosa yang diperoleh hasil tindak balas pencernaan (penyahligninan) anaerobik oleh pencilan LB 2	79
5.3	Kepekatan glukosa yang diperoleh hasil tindak balas pencernaan (penyahligninan) oleh pencilan LB 8Y dan LB 2	80
5.4	Kandungan mutlak α -selulosa dan lignin sisa batang pisang yang diperoleh selepas tindak balas pencernaan (hidrolisis) anaerobik oleh pencilan CB 19	84
5.5	Kandungan mutlak α -selulosa dan lignin sisa batang pisang yang diperoleh selepas tindak balas pencernaan (hidrolisis) anaerobik oleh pencilan CB 10	84
5.6	Kepekatan glukosa yang diperoleh hasil tindak balas hidrolisis oleh CB 19 dan CB 10	85
5.7	Kandungan mutlak α -selulosa dan lignin sisa batang pisang selepas tindak balas pencernaan anaerobik oleh ko-kultur pencilan CB 19 dan LB 8Y	90
5.8	Kepekatan glukosa yang diperoleh hasil tindak balas pencernaan oleh ko-kultur CB 19 dan LB 8Y	90

BAB 1

PENGENALAN

1.1 PENDAHULUAN

Lignoselulosa merupakan satu sumber semulajadi terbanyak di dunia yang boleh diperbaharui (Demain *et al.*, 2005). Ia boleh dijadikan sebagai substrat yang senang didapati dan murah untuk penukaran kepada bahan api alternatif. Secara asasnya, tumbuhan di daratan di seluruh dunia menghasilkan 1.3×10^{10} tan metrik kayu (berdasarkan berat kering) setahun, iaitu bersamaan dengan 7×10^9 tan metrik arang batu atau kira-kira dua pertiga keperluan tenaga dunia. Malahan, bahan mentah selulosik yang terhasil daripada aktiviti pertanian dan sumber-sumber lain adalah sebanyak 180 juta tan setahun (Demain *et al.*, 2005). Tambahan lagi, kadar biosintesis selulosa oleh tumbuhan daratan dan alga marin iaitu kira-kira 0.85×10^{11} tan setahun adalah bersamaan empat kali penggunaan tenaga total tahunan dunia (Saratale *et al.*, 2008). Selain itu, kebanyakan sisa lignoselulosa juga diperolehi daripada sisa industri mahupun sisa perbandaran (Demain *et al.*, 2005).

1.2 PERNYATAAN MASALAH

1.2.1 Sisa pertanian

Pada tahun 2010, kawasan pertanian di Malaysia yang merangkumi tanaman utama seperti kelapa dilaporkan seluas 110 ribu hektar, pisang (29 ribu hektar), dan nanas (17 ribu hektar) oleh Kementerian Perindustrian & Asas Tani Malaysia dalam laporan

Perangkaan Agro Makanan 2010. Selain itu, kawasan tanaman utama lain meliputi tanaman padi, buah-buahan, dan sayur-sayuran. Perkara ini menunjukkan, aktiviti pertanian di negara ini telah menyebabkan lambakan sisa bahan berselulosa dan tidak berselulosa semasa proses penuaian hasil pertanian dilakukan pada setiap tahun. Seterusnya, mengakibatkan pengumpulan sisa-sisa pertanian di ladang atau di kebun pertanian (Abdul Khalil *et al.* 2006). Sisa-sisa pertanian biasanya ditinggalkan di atas tanah, dibuang ke dalam sungai, atau dibakar oleh petani. Malah, sisa-sisa pertanian yang telah diproses di kilang pula akan dilepaskan ke dalam sungai. Justeru, menyebabkan pengumpulan sisa buangan dan pencemaran alam sekitar (Krishna dan Chandrasekaran, 1996).

1.2.2 Krisis bekalan tenaga dunia

Pertambahan populasi penduduk dunia terutama di negara membangun menyebabkan permintaan terhadap bahan makanan, baja, dan bahan api semakin meningkat. Namun begitu, krisis keperluan tenaga yang kian meruncing menyebabkan permintaan ke atas sumber tenaga yang boleh diperbaharui semakin meningkat untuk menggantikan sumber tenaga sedia ada yang diperolehi daripada pembakaran arang batu, serta gas asli dan minyak. Sumber tenaga boleh diperolehi daripada sumber yang boleh diperbaharui seperti solar, angin, biojisim, dan air. Biogas iaitu sumber gas alternatif dapat dijana dengan menggunakan sumber biojisim terutamanya daripada sisa-sisa pertanian untuk menggantikan bentuk tenaga sedia ada. Penjanaan biogas boleh berlaku melalui proses pencernaan anaerobik (Kashyap *et al.* 2003). Penghasilan biometana daripada sisa pertanian dengan menggunakan fermentasi anaerobik bukan sahaja membekalkan sumber tenaga, malah dapat melindungi persekitaran daripada pencemaran dan dapat menghasilkan bahan pepejal yang boleh digunakan sebagai baja dan makanan haiwan.

Walaupun begitu, wujudnya kekangan dalam proses penghasilan biogas apabila menggunakan sumber daripada sisa atau residu pertanian. Hal ini kerana, kebanyakan sisa-sisa tersebut mempunyai komponen yang kompleks dan sukar diuraikan yang

dikenali sebagai lignoselulosa. Komponen ini terdiri daripada lignin, selulosa, dan hemiselulosa iaitu polimer-polimer utama pada dinding sel tumbuhan. Lignin adalah polimer aromatik yang sukar diuraikan oleh mikroba kerana ciri strukturnya yang menyumbang kepada kekuatan dinding sel tumbuhan (Ahmed *et al.*, 2001; Tuomela *et al.*, 2000 dan Raj *et al.*, 2007a). Justeru, pra-rawatan perlu dilakukan terlebih dahulu ke atas sisa untuk menguraikan polimer lignin secara nyahlignifikasi supaya dapat meningkatkan penghasilan biogas. Terdapat beberapa pra-rawatan untuk menyahlignin pada sisa lignoselulosik seperti pra-rawatan fizikal, pra-rawatan kimia, pra-rawatan mekanikal, dan pra-rawatan biologi (Mtui, 2009).

1.2.3 Rawatan biologi ke atas struktur lignin

Lignin merupakan sebatian karbon aromatik yang merupakan juzuk utama dinding sel tumbuhan yang rintang kepada serangan enzim disebabkan oleh sifatnya sebagai sebatian heteropolimerik amorfus hidrofobik (Sánchez *et al.*, 2011). Kehadiran lignin dan hemiselulosa juga merupakan penghalang fizikal tindak balas enzim ke atas struktur selulosa (Ishizawa *et al.*, 2009). Oleh itu, penyingkiran lignin perlu dilakukan supaya tindak balas hidrolisis selulosa kepada gula dapat berlaku dengan lebih cekap.

Proses penyingkiran lignin secara biologi boleh dilakukan menggunakan bakteria seperti strain *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Flavobacteria*, *Xanthomonas*, *Aeromonas*, dan *Cellulomonas*. Bakteria tersebut boleh menguraikan lignin dan sebatian terbitannya (Sánchez *et al.*, 2011). Walaupun tindak balas penyingkiran lignin oleh mikroorganisma memerlukan masa yang lebih panjang, namun tindak balas tersebut berlaku dalam keadaan yang sederhana tanpa memerlukan kuasa tenaga yang tinggi dan reaktor untuk mengawal tenaga dan suhu berbanding rawatan secara kimia atau termal. Di samping itu, proses rawatan secara biologi kurang mempunyai hasil sampingan, lebih mesra alam, dan dapat menghasilkan perolehan yang tinggi (Sánchez *et al.*, 2011).

1.2.4 Sisa batang pisang

Sisa batang pisang (*Musa* sp.) merupakan sisa lignoselulosik yang terhasil daripada aktiviti pertanian. Ia mengandungi kira-kira 39.12% selulosa, 72.71% homoselulosa, dan 8.88% lignin (Li *et al.*, 2010). Faktor kandungan selulosa yang tinggi menyebabkan sisa ini sesuai dijadikan substrat dalam penghasilan gula tertapai bagi penukaran sisa kepada biogas di samping ia mudah diperolehi dengan murah di kawasan tropika dan subtropika (Krishna dan Chandrasekaran, 1996). Justeru, pemencilan strain mikroorganisma baru sangat diperlukan dalam memangkin penyingkiran lignin dan penghasilan perolehan gula daripada sisa batang pisang dengan lebih cekap (Gao *et al.*, 2011).

1.3 RASIONAL KAJIAN

1.3.1 Kepentingan menyaring dan mengenalpasti mikroorganisma dalam prarawatan biologi untuk pencernaan anaerobik

Penyaringan dan pengenaltastian bakteria anaerobik dalam kultur campuran sangat diperlukan untuk mencirikan kultur campuran dan membuktikan berlakunya penyesuaian (acclimatization) kultur campuran dengan sisa batang pisang. Secara tidak langsung, pada masa yang sama, dapat mengenalpasti bakteria anaerobik penyahlignin dan bakteria hidrolisis yang berpotensi dalam metabolisme pencernaan anaerobik untuk penghasilan metana atau biogas. Bacteria penyahlignin dan bakteria hidrolisis yang telah dikenalpasti dapat memangkin tindak balas metabolisme pencernaan anaerobik untuk mendapatkan perolehan gula yang tinggi.

Prestasi bakteria anaerobik pula ditentukan berdasarkan kecekapannya dalam rawatan sisa batang pisang. Maka, sekiranya bakteria yang berpotensi tersebut menunjukkan kecekapan yang tinggi dalam perawatan sisa, peranannya dalam sistem perawatan dapat dikaji dengan lebih terperinci dari segi kinetik, penghasilan, dan tindak balas biokimia dalam sistem rawatan sisa batang pisang. Selain itu, pengenaltastian

mikrob yang berperan dalam rawatan sisa batang pisang dapat memberikan pendedahan berguna untuk kajian selanjutnya terutamanya dalam membina jaringan mikrob pada keseluruhan tapak jalan sistem anaerobik terutamanya untuk rawatan sisa lignoselulosik daripada kultur tulen.

1.4 SKOP KAJIAN

Skop kajian ini meliputi pemencilan, penyaringan, pengenalpastian, dan penilaian prestasi bakteria anaerobik selulolitik dan ligninolitik daripada tanah yang telah mengalami penyesuaian dengan sisa batang pisang. Skop kajian yang terperinci dijelaskan seperti yang berikut:

1. Mengambil sampel tanah dari kebun pisang sebagai sumber kultur campuran dan menyesaikannya (acclimatized) dengan sisa batang pisang.
2. Pemencilan bakteria anaerobik menggunakan medium selektif bagi mendapatkan kultur bakteria hidrolisis (selulolitik) dan bakteria nyahlignin (ligninolitik).
3. Penyaringan bakteria anaerobik secara kualitatif untuk mendapatkan lima bakteria selulolitik dan lima bakteria ligninolitik berpotensi.
4. Mengenalpasti bakteria yang telah disaring menggunakan teknik konvensional dan biologi molekul.
5. Menggunakan dua bakteria selulolitik dan dua bakteria ligninolitik berpotensi yang telah dipilih sebagai inokulum dalam penilaian prestasi pencernaan anaerobik sisa batang pisang.
6. Menilai jumlah perolehan gula, pengurangan kandungan lignin, dan kandungan selulosa sisa batang pisang setelah pencernaan anaerobik dilakukan.

1.5 OBJEKTIF KAJIAN

Objektif umum kajian ini adalah untuk memperoleh pencilan bakteri anaerobik ligninolitik dan selulolitik yang berpotensi tinggi dalam pencernaan anaerobik ke atas sisa batang pisang.

Objektif khusus kajian ini adalah seperti berikut:

1. Memencilkan dan mengenalpasti bakteri anaerobik yang berpotensi dalam hidrolisis selulosa.
2. Memencilkan dan mengenalpasti bakteri anaerobik yang berpotensi dalam penyahligninan.
3. Menilai kecekapan bakteri anaerobik terpilih dalam hidrolisis selulosa dan menyahlignin sisa batang pisang.

BAB 2

ULASAN KEPUSTAKAAN

2.1 BIOJISIM LIGNOSELULOSIK

Biojisim tumbuhan merupakan sumber biojisim lignoselulosik utama yang boleh diperbaharui dan kaya dengan komponen-komponen organik (Noor Hasyierah *et al.*, 2008). Ia meliputi sebahagian besar sisa pertanian dan perbandaran di semua negara di seluruh dunia. Kebanyakan sumber utama bagi bahan lignoselulosik tersebut merangkumi residu dan sisa pertanian seperti batang, daun, rumput, jerami, dan bahagian-bahagian lain tumbuhan yang mempunyai komposisi komponen lignoselulosik yang berbeza-beza. Terdapat tiga komponen utama pada sisa lignoselulosik utama iaitu lignin, selulosa, dan hemiselulosa. Ciri-ciri kimia yang ada pada setiap komponen tersebut menyebabkan ianya sesuai sebagai substrat untuk keberhasilan nilai bioteknologi (Howard *et al.*, 2003). Penggunaan sumber lignoselulosik daripada sisa perhutanan dan pertanian menunjukkan kepelbagaian sumber yang boleh diperoleh untuk penghasilan tenaga dan bahan kimia (Sommer *et al.*, 2004). Tambahan lagi, bahan berlignoselulosik semakin popular sebagai bahan mentah dalam biopenukaran kepada alkohol, bahan kimia yang lain, protein sel tunggal, dan sebagainya (Zhao *et al.*, 2003). Antara hasil sampingan pertanian lain yang merupakan bahan berlignoselulosa ditunjukkan dalam Jadual 2.1.

Jadual 2.1: Komponen utama dari hasil sampingan pertanian berselulosik yang berpotensi untuk kegunaan industri

Hasil sampingan pertanian	Komponen yang berpotensi	Contoh kegunaan industri
Jerami gandum	Selulosa/ hemiselulosa	Etanol
Tongkol jagung	Selulosa/ hemiselulosa	Xilitol/ etanol
Jerami padi	Selulosa/ hemiselulosa	Selulosa/ etanol
Hampas tebu	Selulosa/ hemiselulosa	Etanol
Hampas zaitun	Selulosa/ hemiselulosa/ protein	Lipase/ biogas
Sisa pisang	Selulosa/ hemiselulosa	Enzim untuk lignoselulosa
Sisa sitrus	Karbohidrat/ protein	Pektinase
Kulit kacang	Selulosa/ hemiselulosa	Tetrasiklin

Sumber: Thomsen 2005

2.2 KOMPONEN LIGNOSELULOSA

Lignoselulosa merupakan satu sumber utama bahan organik semulajadi terbanyak yang boleh diperbaharui (Demain *et al.*, 2005) dan bertindak sebagai komponen struktur utama bagi tumbuhan berkayu dan tidak berkayu seperti rumput. Ia terdiri daripada lignin, selulosa, dan hemiselulosa yang berbeza komposisinya (Jadual 2.2). Secara biologi, penguraian tiga polimer tersebut oleh bakteria dan kulat perlu berlaku secara eksosel iaitu samada bersama-sama dengan lapisan sampul sel luaran atau secara ekstrasel disebabkan oleh ciri substrat yang tidak larut. Terdapat dua sistem enzim ekstrasel mikroorganisma untuk penguraian polimer dinding sel tumbuhan (Doi dan Kosugi, 2004) iaitu sistem hidrolase yang berfungsi dalam penguraian selulosa dan hemiselulosa manakala sistem ligninolitik ekstrasel dan oksidatif unik untuk menyahpolimer lignin (Perez *et al.*, 2002).

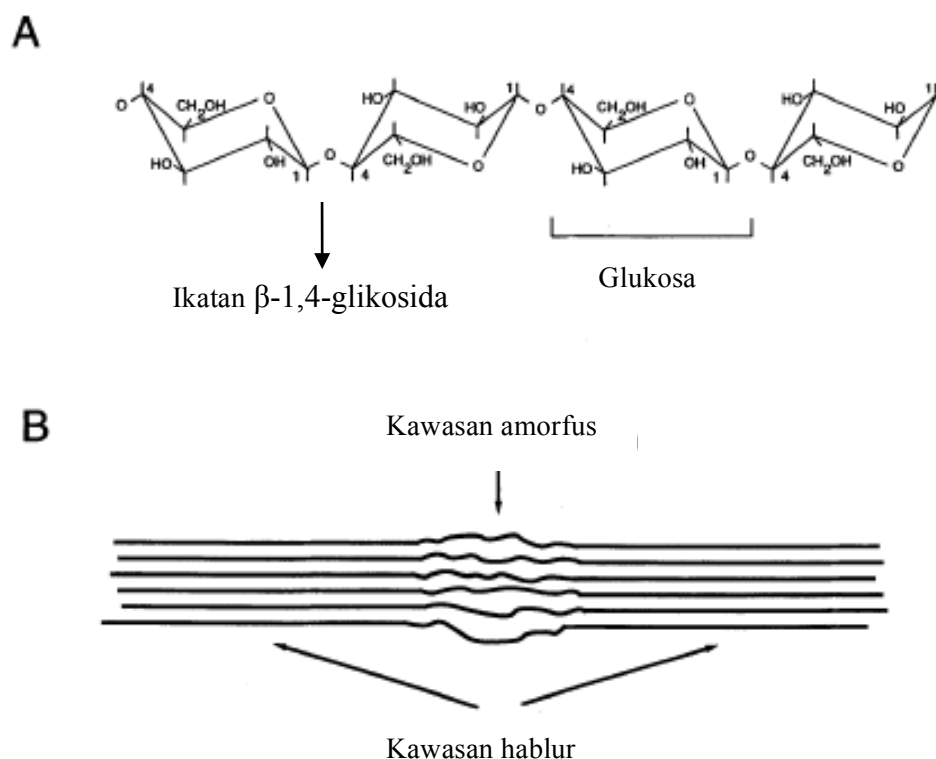
Jadual 2.2: Peratus (%) komposisi lignoselulosa pada residu dan sisa pertanian

Bahan lignoselulosik	Selulosa	Hemiselulosa	Lignin
Rerumput	25-40	25-50	10-30
Batang kayu lembut	45-50	25-35	25-35
Batang kayu keras	45-55	24-40	18-25
Tempurung kacang	25-30	25-30	30-40
Tongkol jagung	45	35	15
Kertas	85-99	0	0-15
Jerami gandum	30	50	15
Daun	15-20	80-85	0

Sumber: Sun dan Cheng 2002

2.2.1 Selulosa

Selulosa merupakan sumber karbon utama di dunia dan sebagai komponen utama pada biojisim tumbuhan. Ia adalah polimer linear unit anhidroglukosa berberat molekul tinggi yang bergabung bersama oleh ikatan β -1,4-glikosida (Rajah 2.1) yang boleh wujud sebagai bahan yang sangat berhablur (Singhania, 2009). Menurut Zhao *et al.* (2003) dan Beguin dan Lemaire (1996), selulosa boleh wujud dalam fasa keterbitan yang tinggi yang merangkumi kawasan berhablur (crystalline) yang disambungkan oleh kawasan amorfus yang kurang tertib dalam tisu semulajadi (Rajah 2.1). Namun begitu, sifat hablurnya dengan campuran bersama hemiselulosa dan lignin menyumbang kepada masalah degradasi yang kompleks (Broda, 1992). Hal ini kerana, selulosa dalam bentuk hablur sangat rintang terhadap degradasi manakala selulosa berbentuk amorfus boleh dihidrolisis dengan lebih cepat oleh mikrob dan enzim. Oleh itu, kadar hidrolisis berenzimatik ke atas selulosa sangat dipengaruhi oleh darjah kehablurannya (Kumar *et al.*, 2008). Tindak balas hidrolisis ini dijalankan oleh enzim selulase dan sangat spesifik untuk menghasilkan produk yang biasanya merupakan gula terturun termasuk glukosa (Sun dan Cheng, 2002).



Rajah 2.1: Struktur selulosa. **A:** Struktur molekul ikatan β -1,4-glikosida antara monomer glukosa. **B:** Struktur fibril selulosa yang meliputi kawasan amorfus dan hablur.

Sumber: Beguin dan Lemaire 1996

2.2.1.1 Biodegradasi selulosa oleh mikroorganisma selulolitik

Kedua-dua bakteria dan kulat boleh menghasilkan selulase untuk proses hidrolisis bahan berlignoselulosik sama ada dalam keadaan aerobik, anaerobik, mesofilik, atau termofilik (Sun dan Cheng, 2002). Antaranya, bakteria di dalam genus *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora*, dan *Streptomyces* (Bisaria, 1991). Selain itu, Kumar *et al.* (2008) turut melaporkan pelbagai strain bakteria seperti *Rhodospirillum rubrum*,

Created with